

宝霍貳元对大鼠急性肾缺血-再灌注损伤的保护作用

廖敏蕾 张广州 徐 中 顾俊英 乔守炎

【摘要】 目的:观察宝霍貳元在大鼠急性肾缺血-再灌注损伤中的保护作用。 方法:采用在体左肾动脉钳夹暂时阻断肾血流法制备大鼠肾缺血-再灌注模型。将 SD 大鼠分为假手术组、溶剂组、药物组,术后饲养 2 周。在术后第 3 天每组取 3 只大鼠肾脏行病理检查,并在术后 3、7、14 d 检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)及 24 h Cr 清除率(CrCI)。

结果:与溶剂组相比,术后 3 d 药物组 BUN 及 Cr 降低。治疗 1 周后药物组 BUN、Cr 及 CrCI 等指标均改善,且达到与假手术组相近的水平。溶剂组各项指标均要在 14 d 后才恢复到假手术组水平。 结论:宝霍貳元可以减轻肾缺血-再灌注后的肾损伤,保护肾功能。

【关键词】 宝霍貳元;肾脏;缺血-再灌注损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.03.014

Protective effect of Baohuosi aglycone against renal ischemia/reperfusion injury in rat LIAO Min-lei¹, ZHANG Guang-zhou², XU Zhong¹, GU Jun-ying¹, QIAO Shou-yan¹. 1. Cardiovascular Department of Shanghai First People's Hospital, Baoshan Branch Institute JiaoTong University; 2. Laboratory Animals Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing

【Abstract】 Objective: To observe the protective effects of Baohuosi aglycone (BA) in renal ischemia/reperfusion (I/R) injury in the rat. **Methods:** A total of 39 healthy male adult Sprague-Dawley (SD) rats were evaluated in three groups. Group I (sham), Group II (renal I/R injury treated with vehicle), Group III (renal I/R injury treated with BA). The model of renal ischemia/reperfusion injury was induced with left renal pedicle occlusion for 50 min followed with reperfusion and then right nephrectomy was performed under anesthesia. The level of BUN, SCr, CrCI were determined in every rat on day 3, 7, and 14 post-operatively. Three rats in every group were sacrificed on day 3 after operation, whose left kidney was harvested for histopathological examinations. **Results:** After three days of operation, the serum concentrations of SCr and BUN in Group III were significant lower in comparison with that in Group II. Seven days after operation, the SCr and BUN in BA treat group had resumed as same level as that in Group I (sham group). On the contrary, renal function in Group II recovered until 14 days postoperatively. **Conclusion:** Baohuosi aglycone could reduce the I/R injury in rat model. It can be a favorable choice for protection of renal I/R injury in clinic.

【Key words】 Baohuosi aglycone; Renal; Ischemia-reperfusion injury

在心肺复苏、心脏体外循环、缺血性休克的救治过程,以及暂时性阻断肾血流的手术后,部分急性肾脏缺血的患者在血供恢复后肾功能不能完全恢复或出现慢性肾功能不全^[1]。缺血-再灌注损伤(IRI)是急性肾功能衰竭的重要机制^[2]。宝霍貳元(Baohuosi aglycone)是类黄酮化合物,为中药淫

羊藿的有效成分。本实验评价宝霍貳元在肾脏缺血-再灌注损伤中的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 12~14 周龄雄性 SD 大鼠(军事医学科学院实验动物中心提供),体质量 240~260 g。实验大鼠均为 SPF 级动物,放置于恒定室温 22℃ 的塑料笼内,每笼 4 只,可自由获得食物和水。室内光线按昼/夜 12 h 的规律变化,实验条件符合中国实验动

物保护的 1 类标准。

1.2 实验试剂

宝藿甙元的分子式为 C₁₂H₂₀O₆, 能在实验室大量合成, 由加拿大蒙特利尔附属圣母医院外科实验室无偿提供。

宝藿甙元的溶剂为 30% tween 80 和 70% 聚乙二醇 400 混合液。

1.3 制备肾缺血-再灌注模型

将 SD 大鼠用 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 沿腹白线纵行切开腹腔, 自动拉钩牵引腹壁, 温盐水包裹保护腹腔肠管、脾、胃等脏器。暴露左肾和左侧输尿管中上段, 然后在手术显微镜下操作, 游离左肾动脉、静脉。用无创性血管夹控制肾动静脉血流, 左肾输尿管上段用另一无创性血管夹控制血供。开始计时, 此时可见左肾由鲜红色转为暗红色, 部分区域苍白, 腹腔内给予 5 ml 温生理盐水, 5-0 号丝线暂时关闭腹腔。阻断左肾动静脉、上段输尿管 50 min 后, 拆去两处血管夹, 恢复左肾血液供应, 即观察到左肾在短时间内由暗红色或黑紫色逐渐转变为鲜红色, 另见左侧输尿管恢复正常蠕动。在左肾血供恢复 1~2 min 后, 暴露右肾, 予以切除, 回纳肠管后逐层关闭腹腔。

1.4 分组

将实验动物随机分成假手术组、溶剂组、药物组, 每组 13 只, 在术后 3 d 每组处死 3 只大鼠做病理检查, 由病理科医师完成。从手术前 2 d 开始, 直

至术后 14 d, 每天上午 9 时给药。假手术组给予 2 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 溶剂组给予混合液 2 ml 每日灌胃 1 次, 药物组给予宝藿甙元 32 mg/kg 每日灌胃 1 次。

1.5 肾功能指标测定

抽血前测定基础体温, 气体麻醉后和异氟烷吸入麻醉下, 自大鼠尾动脉抽血 1.5 ml, 置入试管内离心 5 min 后 (6000 r/min), 取血清送生化室自动生化分析仪测血清尿素氮 (BUN) 和血清肌酐 (Cr)。术后 3、7、14 d 重复测定。术后 14 d 处死动物前自腹主动脉抽取 1.5 ml 血。

将大鼠置入代谢笼, 禁食但可饮水, 收集 24 h 尿量, 取 3~5 ml 测尿 Cr, 于术后 3、7、14 d 分别测定。计算 24 h 肌酐清除率 (CrCl)。

1.6 统计学分析

采用方差分析 (ANOVA) 进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组肾功能比较

术后 3 d 与假手术组相比, 溶剂组和药物组肾功能明显下降, 但药物组较溶剂组有改善的趋势, 但无统计学差异。

术后 7 d 药物肾功能较溶剂组有明显改善 ($P < 0.05$), 且恢复至假手术组水平。

术后 14 d 溶剂组才基本恢复至假手术组水平, 但 CrCl 仍低于假手术组。

表 1 各组大鼠肾功能比较

组别		术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
假手术组	BUN (mg/dl)	10.5 ± 3.96	8.0 ± 1.55	8.7 ± 1.13
	Scr (μmol/L)	51.7 ± 20.96	45.6 ± 6.47	59.1 ± 5.84
	CrCl [ml/(min · 100g)]	0.52 ± 0.13	0.41 ± 0.10	0.33 ± 0.05
溶剂组	BUN (mg/dl)	62.3 ± 33.11 ⁽¹⁾	30.7 ± 30.60 ⁽¹⁾	8.5 ± 4.54
	Scr (μmol/L)	310 ± 215.02 ⁽¹⁾	112.3 ± 89.07 ⁽¹⁾	53.0 ± 13.87
	CrCl [ml/(min · 100g)]	0.08 ± 0.15 ⁽¹⁾	0.14 ± 0.08 ⁽¹⁾	0.19 ± 0.08 ⁽¹⁾
药物组	BUN (mg/dl)	43.0 ± 38.79 ⁽¹⁾	10.4 ± 6.74	7.5 ± 1.67
	Scr (μmol/L)	228 ± 215.74 ⁽¹⁾	47.6 ± 22.87	55.2 ± 4.28
	CrCl [ml/(min · 100g)]	0.15 ± 0.11 ⁽¹⁾	0.37 ± 0.12	0.3 ± 0.05

注: 与假手术组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$

2.2 肾组织病理学改变

术后 3 d, 左肾大体标本可见假手术组肾组织结构没有明显变化, 而药物组和溶剂组大鼠肾脏明显肿大淤血, 呈暗紫色, 皮髓质界限不清。HE 染色光

镜下显示, 假手术组大鼠的肾结构正常, 肾小管排列整齐, 管腔边缘清晰, 间质无充血水肿 (见图 1)。药物组大鼠的肾小球毛细血管轻度充血, 肾小管边界模糊, 管腔变形, 肾髓质毛细血管严重淤血, 间质

充血水肿以外髓最明显,肾小管上皮细胞变性坏死,细胞核溶解,刷状缘消失,其间可见蛋白管型,间质炎性细胞浸润(见图 2)。溶剂组的肾小管坏死

区域和程度更为严重,部分肾小管腔内可见脱落上皮,红细胞和细胞残片(见图 3)。

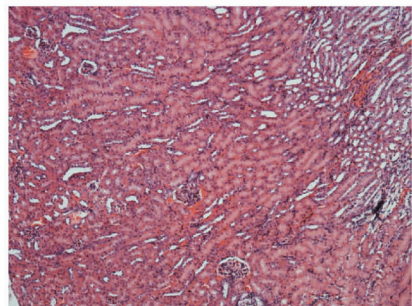


图1 假手术组肾组织(×100)

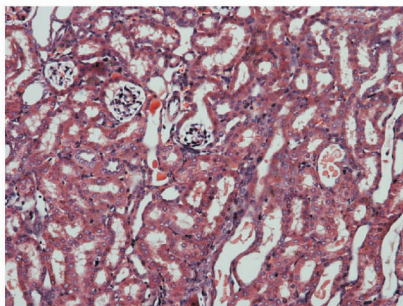


图2 药物组肾组织(×200)

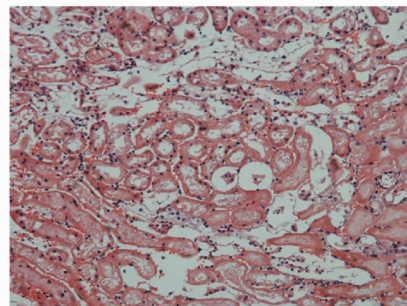


图3 溶剂组肾组织(×200)

术后 14 d 药物组和溶剂组的左肾肿胀减轻,皮髓质界限不清,交界处可见明显紫红色带。HE 染色光镜下观察,两组的肾小管结构无明显异常改变,小动脉管壁无明显增厚,间质无水肿、充血和炎性细胞浸润。

3 讨论

肾脏缺血-再灌注的发生机制尚未明确,可能与肾内氧自由基增多,细胞内钙超载,能量代谢障碍等有关^[3-5]。肾脏的血流量丰富,在缺血-再灌注后氧自由基产生的机会相对较多,过氧化物在缺血肾脏中就会大量产生,这些产物在肾脏中可以使线粒体内自由基增加,使脂氧化酶以及共存的还原型辅酶Ⅱ(NADPH)渗透入中性粒细胞内,产生大量的羟基或者其他过氧化物及大量有害的过氧化亚硝酸盐^[6]。细胞凋亡也在肾脏损伤过程中起重要作用^[7, 8]。

本实验发现在肾脏缺血-再灌注的恢复过程中,宝霍甙元能够在早期改善缺血-再灌注引起的肾功能。溶剂组 CrCl 在 14 d 仍未达到与假手术组水平,可能是因为 CrCl 是反映肾小球滤过功能较敏感指标,要晚于 Cr 和 BUN 的恢复。

宝霍甙元是一种类黄酮,而类黄酮具有抗炎、抗过敏、抗癌作用,尤其是清除氧自由基的作用。它能有效地减少细胞在诱导型 NO 合酶(iNOS)作用下释放 NO 而产生的氧化毒性^[9, 10]。

总之,本实验发现宝霍甙元可以改善肾脏缺血-再灌注后肾功能受损情况,起到保护肾功能的作用。

参 考 文 献

- [1] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure [J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2006, 2(7):364-377.
- [2] Mushi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury [J]. BMC Med, 2011, 9:11.
- [3] Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology [J]. Semin Nephrol, 2004, 24(4): 316-323.
- [4] Noiri E, Nakao A, Uchida K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281(5):F948-F957.
- [5] Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis [J]. Curr Opin Pediatr, 2005, 17(2): 193-199.
- [6] Chen Y, Gill PS, Welch WJ. Oxygen availability limits renal NADPH-dependent superoxide production [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 289(4):F749-F752.
- [7] Vinas J, Hotter G, Pi F, et al. Role of peroxynitrite on cytoskeleton alterations and apoptosis in renal ischemia-reperfusion [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(6): F1673-F1680.
- [8] Sulikowski T, Domanski L, Ciechanowski K, et al. Effect of trimetazidine on xanthine oxidoreductase expression in rat kidney with ischemia-reperfusion injury [J]. Arch Med Res, 2008, 39(4):459-462.
- [9] de Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury [J]. Hepatogastroenterology, 1994, 41(4):328-332.
- [10] Mechels G, Haenen GR, Watjen W, et al. The thiol reactivity of the oxidation product of 3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one containing flavonoids [J]. Toxicol Lett, 2004, 151(1):105-111.

(收稿:2011-10-12 修回:2012-02-01)

(本文编辑:丁媛媛)